

УДК 632.95:543.544:543.51

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛЮФОСИНАТА АММОНИЯ И ЕГО МЕТАБОЛИТА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУРАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2020 г. В. В. Человечкова^{1,2,*}, Н. С. Волосатова^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений
196608 Санкт-Петербург–Пушкин, ш. Подбельского, 3, Россия

²ООО “Инновационный центр защиты растений”
196607 Санкт-Петербург–Пушкин, ул. Пушкинская, 20, лит. А, пом. 7-Н, Россия

*E-mail: vchelovechkova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2019 г.

После доработки 15.11.2019 г.

Принята к публикации 10.02.2020 г.

Предложена методика определения глюфосината аммония (ГФА) и его метаболита 3-метилфосфино-пропионовой кислоты (МФПК) в ботве и клубнях картофеля, в зерне и соломе зерновых колосовых культур с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, после их извлечения из образцов органическим растворителем. Идентификация веществ проведена по времени удерживания, количественное определение – методом абсолютной калибровки. Избирательность метода обеспечена сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования.

Ключевые слова: глюфосинат аммония, 3-метилфосфино-пропионовая кислота, ботва, клубни картофеля, зерно, солома, масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S0002188120050051

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в мировой практике прослежена тенденция к снижению уровня пестицидных остатков в сельскохозяйственной продукции и окружающей среде, поскольку от этого напрямую зависит здоровье населения планеты и его сохранение.

Необходимость определения пестицидов в объектах со сложной матрицей выдвигает особые требования к селективности соответствующих анализов. Наибольшее распространение получили хроматографические методы – газожидкостная и высокоэффективная жидкостная хроматография. Для обнаружения следовых количеств пестицидов хорошо зарекомендовал себя масс-спектрометрический детектор [1]. Такой метод детектирования является наиболее чувствительным и селективным, а в некоторых случаях позволяет пренебречь стадией очистки экстрактов, что уменьшает потери аналита и сокращает трудо- и времязатраты на анализ.

Данная работа посвящена разработке метода определения глюфосината аммония (ГФА) и его метаболита – 3-метилфосфино-пропионовой кислоты (МФПК) в ботве и клубнях картофеля, в зерне и соломе зерновых колосовых культур с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Из более ранних методов известен метод определения с применением пластин “силуфол” и обнаружением этих веществ по реакции с нингидридом и методика дериватизации с применением газожидкостной хроматографии.

Глюфосинат аммония (рис. 1) – аммоний *DL*-гомоаланин-4-ил-(метил)-фосфинат, брутто формула – $C_5H_{15}N_2O_4P$, молекулярная масса – 198.2 D. Химически чистое вещество представляет собой кристаллический порошок со слабым специфическим запахом. Температура плавления – 215°C, коэффициент распределения в системе *n*-октанол–вода – $Kow \log P < 0.1$ (22°C), давление паров – <0.1 мПа. Растворимость (г/дм³, 20°C) в: воде – 1370, ацетоне – 0.16, этаноле – 0.65, этилацетате –

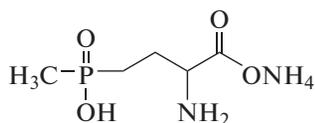


Рис. 1. Структурная формула глюфосината аммония (ГФА) То же на рис. 3, 4.

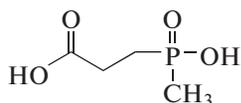


Рис. 2. 3-метилфосфино-пропионовая кислота (МФПК). То же на рис. 3, 4.

0.14, толуоле – 0.14, гексане – 0.2. В нормальных условиях, в щелочных и умеренно кислых средах вещество стабильно.

Глюфосинат аммония – не селективный, контактный десикант с ограниченной системностью, передвигающийся только внутри обработанных листьев. Используется для уничтожения однолетних и многолетних широколистных и злаковых сорняков в парах, посадках плодовых и цитрусовых культур, ягодных кустарников и на виноградниках, а также в посевах овощных культур при дождевом применении препарата. В РФ для глюфосината аммония установлены следующие гигиенические нормативы (ГН 1.2.3539-18): картофель – 0.5, рапс (зерно) – 5.0, гречиха, просо, зерно хлебных злаков – 0.4 мг/кг. В воде и растениях подвержен разрушению с образованием метаболита – 3-метилфосфино-пропионовой кислоты (рис. 2).

Брутто формула 3-метилфосфино-пропионовой кислоты – $C_4H_9O_4P$, молекулярная масса – 152.1 D. Представляет собой белый кристаллический порошок. Температура плавления – 288–291°C. Растворима в воде и метаноле.

Цель работы – разработка метода определения глюфосината аммония и его метаболита 3-метилфосфино-пропионовой кислоты в ботве и клубнях картофеля, в зерне и соломе зерновых колосовых культур с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробу измельченной ботвы, клубней картофеля, зерна (5 г) или соломы (2 г) помещали в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 50 мл, добавляли 10 мл раствора соляной кислоты в метаноле, в соотношении 1:99, для соломы – 20 мл. Пробирку плотно закрывали, по-

мещали в перемешивающее устройство на 15 мин, затем на 10 мин в центрифугу. После этого аликвоту экстракта 6 мл переносили в пробирку объемом 15 мл, содержащую 0.180 г PSA (Сорбент для твердофазной экстракции на основе силикагеля с привитыми пропиламинными группами $(CH_2)_3NH_2$), повторно помещали на 10 мин в перемешивающее устройство и затем центрифугировали в течение 10 мин при скорости 4000 об./мин. После отбирали 1 мл верхнего слоя и переносили в круглодонную колбу, упаривали на ротационном испарителе досуха. Сухой остаток растворяли в 1 мл 0.5%-ного раствора муравьиной кислоты в воде и 5 мкл вводили в хроматограф.

Инструментальная часть. Все испытания были выполнены на хромато-масс-спектрометре, Bruker EVOQ Cube производства фирмы Bruker, состоящем из высокоэффективного жидкостного хроматографа “Bruker Advanced UHPLC” и масс-спектрометра “Bruker модели EVOQ Cube”. Разделение компонентов проб проводили на аналитической колонке “Teruo Acclaim RSLC” (100 × 2.1) мм, 2.2 мкм. Температура колонки 40°C.

В качестве элюента использовали смесь метанола и 0.5%-ного раствора муравьиной кислоты в воде, пробы анализировали в различных градиентных режимах.

Пробы ботвы и клубней картофеля анализировали со скоростью потока элюента 0.15 мл/мин. Режим элюирования – изократический: фаза А – 0.5%-ная муравьиная кислота, фаза В – метанол в соотношении 99:1. Пробы зерна анализировали в том же режиме, что и картофель, но со скоростью потока элюента 0.3 мл/мин.

Режим элюирования – градиентный:

Время, мин	% А	% В
0	99	1
1.00	70	30
1.50	70	30
1.51	99	1
3.00	99	1

Пробы соломы анализировали в следующем режиме:

Время, мин	% А	% В	Скорость потока элюента, см ³ /мин
0	99	1	0.15
1.5	60	40	0.15
2.5	60	40	0.30
3.5	60	40	0.30
4.0	99	1	0.15
4.5	99	1	0.15

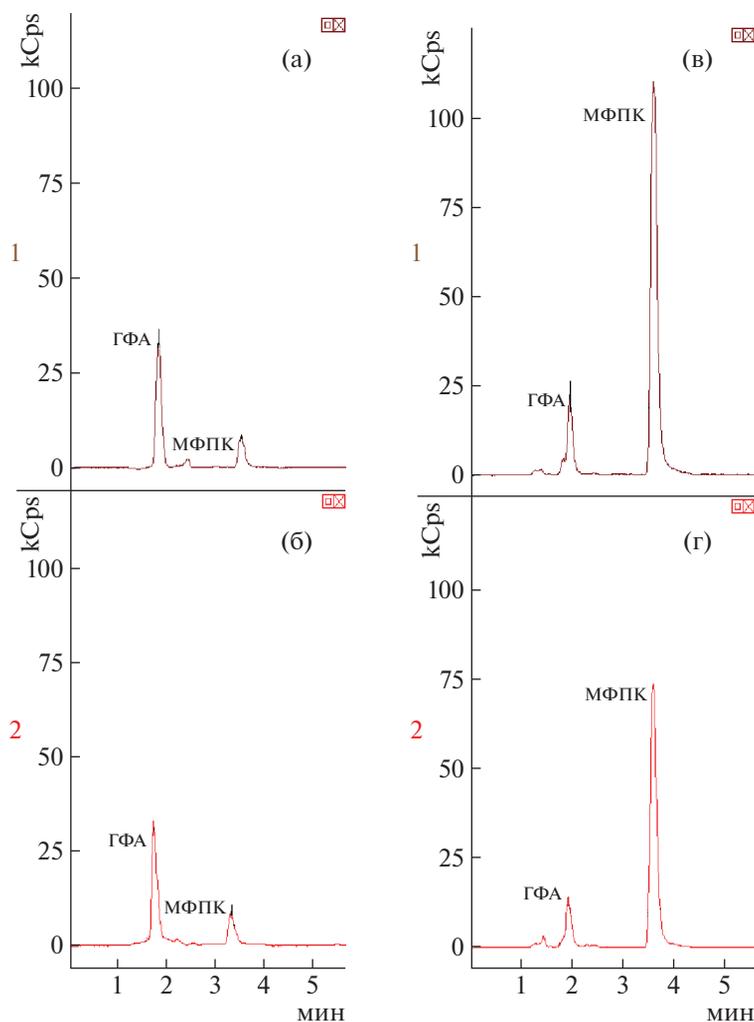


Рис. 3. Хроматограммы проб картофеля на содержание глифосината аммония: (а) – стандартных растворов ГФА и МФПК, соответствующих содержанию в ботве картофеля по 0.025 мг/кг (предел обнаружения); (б) – контрольной пробы ботвы картофеля с внесением ГФА и МФПК по 0.025 мг/кг; (в) – стандартных растворов ГФА и МФПК, соответствующих содержанию в клубнях картофеля по 0.25 мг/кг (1/2 максимально допустимого уровня); (г) – контрольной пробы клубней с внесением ГФА и МФПК на уровне 0.25 мг/кг.

Масс-спектрометрические условия – ионный источник HESI (электроспрей): 1 – для ботвы и клубней картофеля. Напряжение на источнике 4200 V (отрицательная полярность), температура конуса 250°C, поток газа из конуса 20 дм³/мин, поток распыляющего газа 50 дм³/мин, температура осушающего газа 650°C, поток осушающего газа 40 дм³/мин. Режим сканирования: мониторинг заданных реакций (MRM) глифосината аммония – 180 → 63, 180 → 85, 180 → 95 и 3-метилфосфинопропионовой кислоты – 151 → 63, 151 → 107, 151 → 133; 2 – для проб зерна и соломы. Напряжение на источнике 5000 V (отрицательная полярность). Температура конуса 250°C, поток газа из конуса 20 дм³/мин, поток распыляющего газа 40 дм³/мин, температура осушающего газа 280°C, поток осу-

шающего газа 40 дм³/мин. Режим сканирования: мониторинг заданных реакций (MRM) глифосината аммония – 180 → 63, 180 → 85, 180 → 95 и 3-метилфосфинопропионовой кислоты – 151 → 63, 151 → 107, 151 → 133 (рис. 3, 4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К более ранним методам определения относится метод, основанный на концентрировании водного экстракта, очистке и выделении ГФА на колонке с полисорбом и определении из аликвоты подготовленного экстракта хроматографией на пластинках “силуфол” с обнаружением по реакции с нингидрином [2].

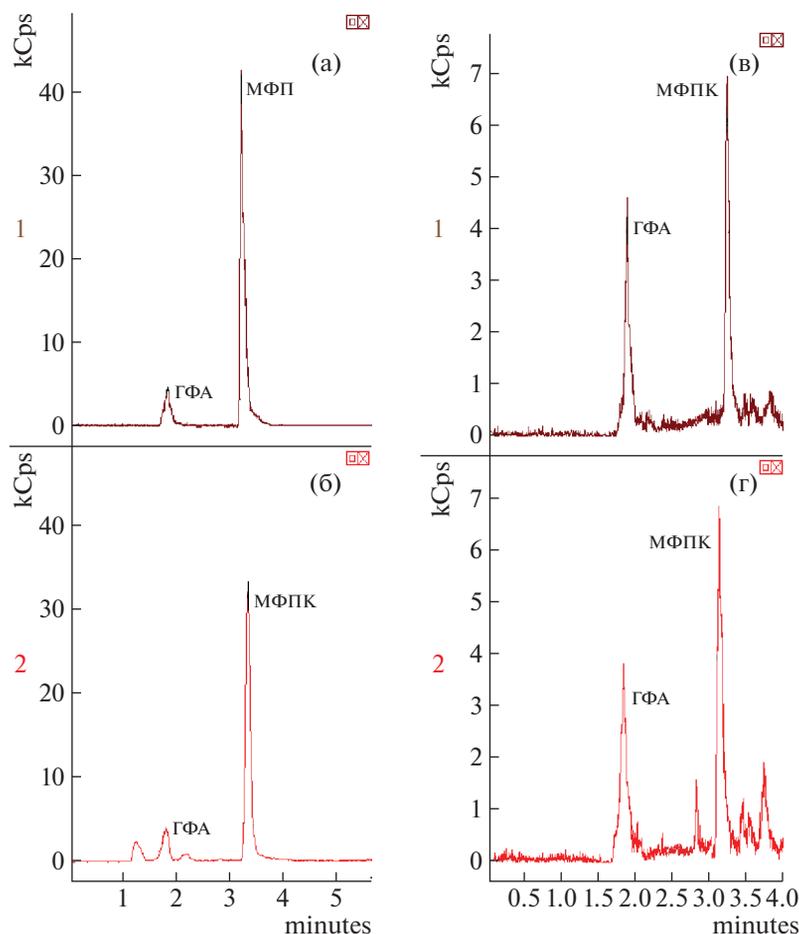


Рис. 4. Хроматограммы проб зерна и соломы на содержание глюфосината аммония: (а) – стандартных растворов ГФА и МФПК, соответствующая содержанию в зерне 0.2 мг/кг (1/2 МДУ); (б) – контрольной пробы зерна с внесением ГФА и МФПК по 0.2 мг/кг (1/2 МДУ); (в) – стандартных растворов ГФА и МФПК, соответствующая их содержанию в соломе по 0.125 мг/кг (предел обнаружения); (г) – контрольной пробы соломы с внесением ГФА и МФПК на уровне 0.125 мг/кг (предел обнаружения).

Для клубней картофеля (диапазон 0.25–2.5 мг/кг) известен метод для определения ГФА и его метаболита МФПК по их дериватам с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии с использованием термоионного детектора после экстракции веществ из образцов водой, очистки экстрактов на концентрирующих патронах для твердофазной экстракции с сильноосновным сорбентом с привитыми четвертичными аммониевыми группами, дериватизации веществ с помощью триметилортоацетата в кислой среде и последующей очистки полученных дериватов на концентрирующих патронах для твердофазной экстракции с гидрофильным слабокислым сорбентом с постоянной активностью [3].

Данные методики являются очень трудоемкими и требующими значительных количеств разнообразных реагентов и дополнительных операций в процессе пробоподготовки. Использование

метода ВЭЖХ-МС позволяет анализировать пробы без предварительных модификаций.

В предложенном нами методе пробоподготовки проверяли такой параметр, как продолжительность экстракции. Установлено, что увеличение промежутка времени на стадии экстракции на извлечение искоемых компонентов не влияет. В МУК 4.1.3343-16 [4] экстрагирование проводят в течение 1 ч на аппарате для встряхивания. Нами было установлено, что достаточно 10 мин на этой стадии, чтобы получить извлечение >80%.

В качестве экстрагента пробовали применять смесь муравьиной кислоты и метанола, однако в этом случае хроматографический профиль был более загрязнен посторонними пиками. Поэтому заменили в составе экстракционной смеси муравьиную кислоту на соляную, что привело к лучшему результату.

Таблица 1. Объекты анализа, диапазоны определяемых концентраций, полнота извлечения глюфосината аммония и 3-метилфосфино-пропионовой кислоты (стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для $n = 20$, $P = 0.95$)

Анализируемый объект	Предел количественного определения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Полнота извлечения вещества, %	Стандартное отклонение, %	Доверительный интервал среднего результата, \pm %
Глюфосинат аммония					
Ботва картофеля	0.025	От 0.025 до 0.2 включительно	90.6	4.17	1.83
Клубни картофеля	0.025	От 0.025 до 0.2 включительно	91.3	5.87	2.57
Зерно	0.025	От 0.025 до 0.2 включительно	80.9	4.39	1.92
Солома	0.125	От 0.125 до 1.0 включительно	80.8	3.11	1.36
3-метилфосфино-пропионовая кислота					
Ботва картофеля	0.025	От 0.025 до 0.2 включительно	94.1	6.18	2.71
Клубни картофеля	0.025	От 0.025 до 0.2 включительно	81.5	5.53	2.43
Зерно	0.025	От 0.025 до 0.2 включительно	82.0	4.05	1.77
Солома	0.125	От 0.125 до 1.0 включительно	86.7	3.36	1.47

На этапе очистки в качестве сорбента использовали активированный уголь, силикагель, оксид алюминия, но наилучший результат по доле извлечения и чистоте профиля дал сорбент для твердофазной экстракции на основе силикагеля с привитыми пропиламинными группами $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$.

В процессе изучения хроматографического поведения ГФА и МФПК удалось добиться их совместного определения на наиболее широко применяемой для ВЭЖХ колонке, заполненной сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами C_{18} . Разные масс-спектрометрические условия для анализа проб картофеля и зерновых, а также калибровка по матрицам связаны с необходимостью нивелирования матричного эффекта.

Таким образом, в результате совокупности подобранных этапов выделения, очистки и идентификации удалось добиться полноты извлечения исследованных веществ в диапазоне 80–91%, в зависимости от анализируемого объекта (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследования были подобраны оптимальные условия для совмест-

ного извлечения и количественного определения двух веществ — глюфосината аммония и его метаболита 3-метилфосфино-пропионовой кислоты в сельскохозяйственной продукции. Дополнительная очистка экстрактов проб позволила значительно продлить срок эксплуатации хроматографической колонки и значительно сократить временные затраты на подготовку к выполнению измерений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долженко В.И., Цибульская И.А., Комарова А.С., Черменская Т.Д. Определение остаточных количеств валифеналата в воде, почве, ботве и клубнях картофеля, винограде и виноградном соке, и его метаболитов (IR 5839 и РСВА) в воде и почве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Метод. указ. (МУК 4.1.3410-16). М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017. 20 с.
2. Новикова К.Ф., Калинин В.А., Гиренко Д.В., Борисов Г.С., Устинова Т.Н. Методические указания по определению микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде (МУ № 6190-91). Сб. № 22. М.: Центр научно-технической информации, пропаганды и рекламы, 1994. 20 с.

3. *Калинин В.А., Калинина Т.С.* Определение остаточных количеств глюфосината аммония и его метаболита в клубнях картофеля методом капиллярной газожидкостной хроматографии (МУК 4.1.3205-14). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. 26 с.
4. *Корзун Т.А., Сухова В.Л., Добрева Н.И., Добрев С.Д., Джанпаридзе М.Т.* Измерение остаточного содержания глюфосината аммония и его метаболита 3-метилфосфино-пропионовой кислоты в семенах и масле подсолнечника, семенах и масле рапса, семенах гороха методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (МУК 4.1.3343-16). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016. 19 с.

Optimization of the Method for Determining Ammonium Glucosinate and Its Metabolite in Agricultural Crops Using High-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection

V. V Chelovechkova^{a,b,#} and N. S. Volosatova^{a,b}

^aAll-Russian Research Institute of Plant Protection
sh. Podbelskogo 3, St. Petersburg–Pushkin 196608, Russia

^bLtd. “Innovation Center of Plant Protection”
Pushkinskaya ul. 20-A, 7-H, St. Petersburg–Pushkin 196607, Russia

[#]E-mail: vchelovechkova@mail.ru

A method for the determination of glufosinate ammonium (GFA) and its metabolite 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPC) in potato and cereal crops by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was proposed. GFA and MPPC were extracted from samples with an organic solvent. Identification of substances was carried out by retention time, quantitative determination – by the absolute calibration method. The selectivity of the method is ensured by a combination of sample preparation and chromatography conditions.

Key words: glufosinate ammonium, 3-(methylphosphinico)propionic acid, top, potato tubers, grain, straw, mass spectrometry.